

## 조건불리지역 재배를 위한 산화스트레스 내성 고구마 품종의 선발

김윤희 · 박성철 · 양경실 · 주지린 · 자오동란 · 마다이푸 · 정재철 · 이행순 · 곽상수

### Selection of oxidative stress-tolerant sweetpotato cultivars for cultivation on marginal lands

Yun-Hee Kim · Sung-Chul Park · Kyoung-Sil Yang · Zhilin Zhou · Donglan Zhao · Daifu Ma · Jae Cheol Jeong · Haeng-Soon Lee · Sang-Soo Kwak

Received: 17 August 2009 / Accepted: 31 August 2009  
© Korean Society for Plant Biotechnology

**Abstract** Oxidative stress derived from excess reactive oxygen species (ROS) is a major damaging factor for plants exposed to environmental stresses. Sweetpotato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam] has a relatively broad adaptability to harsh environmental conditions compared to other staple crops. In this study, to select stress-tolerant sweetpotato cultivars for sources of molecular breeding on marginal lands, we evaluated the ion leakage values in 10 different cultivars after treatment of methyl viologen (MV), an ROS-generating non-selective herbicide, to leaf discs. DPPH radical scavenging activity and the contents of total phenolics were also investigated. The ion leakage of each cultivar showed a diverse value, which is well correlated with DPPH radical scavenging activity of each cultivar. DPPH radical scavenging activity also showed a high correlation with the contents of total phenolic contents. Three cultivars of Yanshu 8, Shinhwangmi and Shinzami showed high antioxidant activity. Our results suggest that a simple and efficient DPPH radical scavenging activity would be a suitable method to select potential cultivars with enhanced tolerance to multiple environmental stress.

Y.-H. Kim · S.-C. Park · K.-S. Yang · J. C. Jeong · H.-S. Lee · S.-S. Kwak (✉)  
한국생명공학연구원 환경바이오연구센터  
(Environmental Biotechnology Research Center, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB), Oun-dong 52, Yuseong-gu, Daejeon 305-806, Korea)  
e-mail: sskwak@kribb.re.kr

Z. Zhou · D. Zhao · D. Ma  
중국농업과학원 고구마연구소  
(Sweetpotato Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences (CAAS), Xuzhou 221121, China)

### 서론

산업혁명 이후 급격한 산업화와 인구증가는 지구적인 규모의 환경재앙을 초래하고 있다. 석탄, 석유 등 화석에너지의 과도한 사용은 대기 중 이산화탄소 등 온실가스 농도를 상상을 초월하는 속도로 증가시켜 지구온난화 등 환경문제를 초래하고 있다. 환경문제는 생물다양성 변화, 사막화 확산을 초래할 뿐 아니라 농업생산성에도 영향을 주어 세계적인 식량문제를 초래할 것으로 예상되어 조건불리지역에 적합한 재해내성 식량작물의 개발이 시급하다.

식물이 과도한 스트레스를 받게 되면 생체내 산소가 superoxide anion radical ( $O_2^-$ ), hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ), hydroxyl radical ( $OH^\cdot$ ) 등의 반응성이 높은 독성의 활성산소종 (reactive oxygen species, ROS)으로 변하게 된다. 다양한 환경스트레스에 의해 유발되는 활성산소종의 과다발생은 식물의 생산성을 감소시키는 주요 요인이 되고 있다. 이러한 과다한 활성산소종에 의한 산화스트레스는 식물의 대표적 방어기구인 superoxide dismutase (SOD), ascorbate peroxidase (APX), peroxidase (POD), catalase (CAT) 등의 항산화효소와 ascorbic acid와 glutathione과 같은 저분자 항산화물질 등에 의해 효율적으로 제거된다 (Noctor and Foyer 1998; Asada 1999). 환경스트레스에 대한 내성을 향상시키기 위하여 항산화기구를 강화시킨 식물품종의 선발 및 형질전환 식물체 개발에 관한 많은 연구가 진행되고 있고 금후 환경재해에 강한 실용적인 농작물의 분자육종이 기대된다.

고구마 [*Ipomoea batatas* (L.) Lam]는 세계 7대 식량작물로서, 다른 주곡작물에 비해 척박한 지역에서도 비교적 잘 자라는 재배특성이 있다. 따라서 건조지역, 공해지역, 간척지역 등 조건불리지역에 재배 적합한 환경재해내성 고구마 품종의 개발은 사료나 식량자원의 확보 뿐 아니라 탄소배출권 확보를 통한 친환경 에너지 생산에도 크게 기여할 수 있을 것으로 생각된다. 특히 추위와 가뭄에 강한 고구마의 생산은 북한지역이나 중국 일부의 사막지대를 포함한 조건불리지역에서도 재배가 가능할 것이다.

저자들은 고구마의 항산화기작연구를 식물의 대표적 항산화효소인 POD를 중심으로 진행해 오고 있다. 현재까지 13종의 POD 유전자들 고구마의 배양세포와 건조 처리된 싹뿌리에서 분리해 다양한 스트레스 조건에서의 발현특성을 조사한 바 있으며 (Huh et al. 1997; Kim et al. 1999; 2000; Park et al. 2003; Jang et al. 2004; Kim et al. 2007; 2008b), 특히 최근 다양한 스트레스에 높은 발현 특성을 보인 POD 유전자들을 이용하여 형질전환 담배에서 MV 및 다양한 스트레스에 대한 내성을 보고한 바 있다 (Yun et al. 2000; Kim et al. 2008a). 고구마 POD 연구의 결과로써 높은 항산화효소활성이 실제 식물의 스트레스 내성을 증가시킴을 확인한 바 있다. 또한 최근 6 품종의 알팔파를 이용하여 건조와 고염 스트레스에 내성을 보이는 알팔파 품종이 높은 항산화활성을 보임을 증명하바 있다 (Wang et al. 2009). 본 연구에서는 조건불리지역에 재배 적합한 품종을 선별하기 위해, 10 품종의 고구마 잎을 대상으로 methyl viologen (MV)을 처리하여 이온전도도, DPPH radical 소거활성, 전체 페놀함량을 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 식물재료

실험에 사용된 10 품종의 고구마 (*Ipomoea batata* L. Lam.) 식물체는 온실에서 8 주간 생육된 것을 이용하였다. 신향미 (cv. Shinhwangmi), 신자미 (cv. Shinzami), 울미 (cv. Yulmi)는 국립식량과학연구원 바이오에너지작물센터에서 분양 된 것이며, cv. Huiza 6, cv. Nanjing 9, cv. Wanshu 2, cv. Xiangza 9, cv. Yanshu 8, cv. Yizi 138은 중국 농업과학원 고구마연구원으로부터 분양받아 이용하였다. 화이트스타 (cv. Whitestar)는 저자들의 팀에서 보유하고 있는 것을 이용하였다.

## Methyl viologen 처리 및 이온 전도도 조사

산화스트레스원인 MV 처리 및 이온전도도 분석은 Lim 등 (2007)의 방법을 이용하였다. MV 처리를 위해 온실에서 생육 8 주된 식물체의 잎 (위로부터 5-7번째) 으로부터 8 mm 직경의 잎 disc를 7 개씩 취해 5  $\mu$ M의 MV를 포함하는 0.4% sorbitol 용액 5 mL씩 들어있는 직경 5 cm의 Petri dish에 각각 띄웠다. 25°C의 암 조건에서 12 시간동안 배양하여 MV가 흡수되도록 한 후 연속 광 조건에서 24시간 배양하여 12시간 간격으로 전기전도도계 (model 455C, Istek, Co., Korea)를 이용하여 용액의 이온 전도도를 측정하여 잎의 손상 정도를 조사하였다.

## DPPH radical 소거능력 분석

DPPH 분석은 Padda와 Picha (2008)의 방법을 변형하여 사용하였다. Ethanol을 이용하여 추출된 고구마 잎 disc 추출물을 0.5 mM DPPH 시약과 30 분간 반응시킨 후, 517 nm에서 spectrophotometer를 사용하여 흡광도를 측정하였다. 표준값으로 ascorbic acid (AsA)를 사용하였다. 고구마 잎의 DPPH 라디칼 소거능력은 잎 생체중 1 g에 해당하는 ascorbic acid 용량 (mg)에 따른 항산화 능력으로 표시하였다.

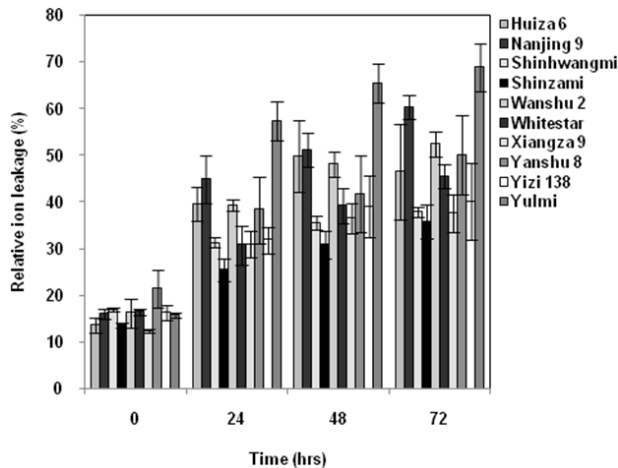
## 전체 페놀함량 조사

전체 페놀함량은 변형된 Stadnik와 Buchenauer (2000)의 방법을 변형하여 사용하였다. Methanol을 이용하여 추출된 고구마 잎 disc 추출물을 0.2N Folin-Ciocalteu's phenol 50  $\mu$ l와 20% sodium carbonate 100  $\mu$ l와 혼합 후 20분후 725 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준값으로 chlorogenic acid (Chl A)를 사용하였다. 고구마 잎의 페놀 함량은 잎 생체중 1 g에 해당하는 chlorogenic acid 용량 (mg)으로 표시하였다.

## 결과 및 고찰

### 고구마 잎 disc를 이용한 MV 스트레스에 대한 내성 분석

잎 disc 수준에서 고구마 10 품종의 MV에 의해 유도되는 산화스트레스에 대한 반응성을 확인하기 위해, 5  $\mu$ M MV 처리 조건하에서 각 품종의 잎 disc를 이용하여 이온전도도를 조사하였다 (Fig. 1). MV 처리에 의해 모든 고구마 품종들은 다양하게 반응하였으며, 세포손상을 나

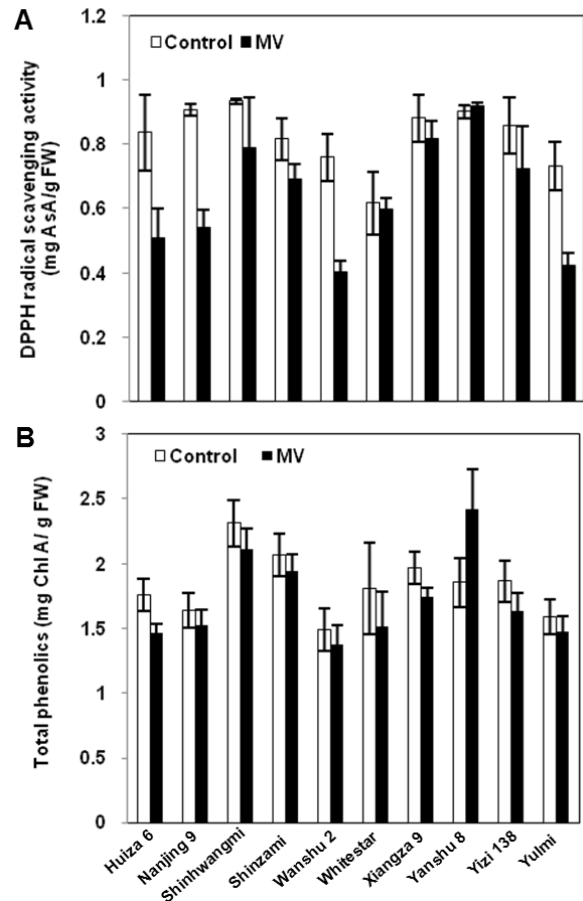


**Fig. 1** Ion leakage analysis of 10 sweetpotato cultivars using leaf discs in response to 5  $\mu$ M MV treatment for 72 hours. The electrical conductivity of the MV solution was compared with the total conductivity of the solution following tissue destruction. Data presented are the average of three replicates

타내는 이온전도도 수치는 크게 증가하였다. 처리된 고구마 품종들 중 신허미, 신자미, Xiangza 9, Yizi 138은 MV 처리 후 72시간째까지 약 35.8-40.1%의 낮은 이온전도도 수치를 보여 MV에 강한 내성을 보임을 알 수 있었다. 반면에 울미와 Nanjing 9은 처리 후 72 시간째에 68.8%와 60.5%의 높은 이온 전도도를 보임으로써 MV에 의해 생성되는 산화스트레스에 대해 강한 감수성을 보임을 알 수 있었다. 선행 연구결과에서 항산화효소인 CuZnSOD와 APX를 동시에 과발현 시킨 형질전환 고구마와 NDPK2를 과발현시킨 고구마가 MV에 의해 강한 내성을 보임이 보고된 바 있다 (Lim et al. 2007; Kim et al. 2009). 또한 MV 저항성 완두 품종 (*Pisum sativum* cv. Alaska)의 경우 감수성 품종보다 높은 MnSOD와 CAT 활성을 보였다 (Emdadul Haque et al. 2008). 그러므로 본 연구결과의 MV 내성을 보이는 신허미, 신자미, Xiangza 9, Yizi 138는 다량의 항산화효소 및 저분자 항산화 물질을 함유하고 있어 MV에 의해 생성되는 산화스트레스에 내성을 보였을 것으로 생각된다.

**MV 스트레스에 대한 고구마의 활성산소 제거능력과 전체 페놀함량의 변화**

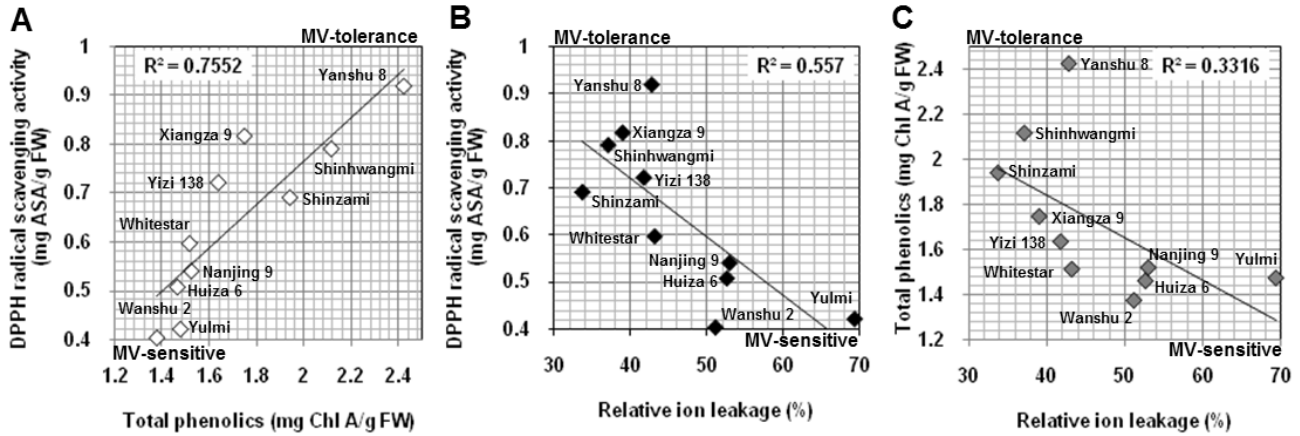
MV 처리 조건하에서 각 고구마 잎 disc의 항산화 활성을 확인하기 위하여 DPPH radical 소거활성을 조사하였다 (Fig. 2A). 무처리 조건에서는 10 품종의 고구마들 중 3 품종 Wanshu 2, 화이트스타, 울미가 각각 가장 낮은 항산화 활성을 보였다. Wanshu 2, 화이트스타, 울미는 0.76, 0.62,



**Fig. 2** Changes in antioxidant activity of 10 sweetpotato cultivars using leaf discs in response to 5  $\mu$ M MV treatment. A, DPPH radical scavenging activity of leaf discs in sweetpotato at 48 hours under 5  $\mu$ M MV treatment. B, Total phenolic contents of leaf discs in sweetpotato at 48 hours under under 5  $\mu$ M MV treatment. Data presented are the average of three replicates

0.73 mg의 AsA가 갖는 항산화활성을 1 g의 시료내에 갖고 있었다. 나머지 품종들은 무처리 조건에서 0.81-0.93 mg AsA의 항산화활성을 1 g 시료내에 보였다. 반면에 MV 처리조건에서는 이온전도도 조사결과와 유사하게 MV 내성을 보였던 신허미, 신자미, Xiangza 9, Yanshu 8, Yizi 138가 0.69-0.91 mg AsA의 높은 항산화 활성을 보였으며, MV에 감수성을 보였던 울미와 Wanshu 2가 각각 0.4와 0.42 mg AsA의 낮은 항산화 활성을 보였다.

폴리페놀은 항산화활성을 갖는 대표적 물질로 잘 알려져 있으며, 식물이 환경스트레스에 노출되면 체내의 chlorogenic acid나 anthocyanin과 같은 폴리페놀계의 항산화물질이 분비되어 화학적 방어작용을 수행함이 보고된 바 있다 (Rice-Evans et al. 1997; Sgherri et al. 2004; Padda and Picha 2008). 그러므로 대표적 항산화 활성을 갖는 물질인 전체 페놀함량을 조사하였다 (Fig. 2B). DPPH 라디칼



**Fig. 3** Relationship between ion leakage and antioxidant activities in 10 sweetpotato cultivars under MV-mediated oxidative stress. A, Relationship between DPPH radical scavenging activity and total phenolics. B, Relationship between DPPH radical scavenging activity and relative ion leakage. C, Relationship between total phenolics and relative ion leakage

소거활성 결과와 유사하게 신허미, 신자미, Xiangza 9, Yanshu 8이 무처리와 MV 처리 조건에서 높은 전체 페놀 함량을 보였으며, 율미와 Wanshu 2가 낮은 전체 페놀 함량을 보였다. 그러므로 본 실험결과들을 통해 MV내성을 보이는 품종인 신허미, 신자미, Xiangza 9, Yanshu 8가 높은 항산화 활성을 보이며, 이는 식물체내에 증가된 전체 페놀함량과 관계가 있을 것으로 생각된다. 또한 MV 감수성 품종인 율미와 Wanshu 2는 MV에 의한 산화스트레스 발생시 전체 페놀함량 감소를 포함한 항산화활성의 감소에 의해 산화스트레스에 대한 손상이 더 증가함을 알 수 있다.

이상의 실험에서, MV 처리 시 각 품종의 항산화활성을 조사한 결과인 DPPH radical 소거활성과 전체 페놀 함량을 비교한 결과가 가장 높은 상관관계를 나타냄을 알 수 있다 ( $R^2=0.7552$ )(Fig. 3A). 또한 MV 처리시의 항산화활성과 내성정도를 나타내는 이온전도도와 상관관계는 DPPH radical 소거활성이 전체 페놀함량보다 높은 결과를 보였다 (Fig. 3B and C). 그러므로 식물의 잎 disc를 이용한 산화스트레스 내성 및 높은 항산화활성을 갖는 품종 선발 시 이온전도도와 DPPH radical 소거활성 실험을 병행하는 것이 매우 효율적일 것으로 생각된다. 본 연구의 결과는 MV에 의해 유도되는 산화스트레스에 대해 높은 내성을 보이는 고구마 품종들이 페놀을 포함한 다양한 내생 항산화활성의 증가에 의해 MV에 의해 유도되는 활성산소를 효과적으로 제거하여 산화스트레스에 대한 내성이 증가된 것으로 사료된다. 향후 더 많은 고구마 품종들을 이용하여 산화스트레스에 대한 내성 및 항산화

활성을 조사할 예정이다. 또한, 식물체 수준에서 산화스트레스에 대한 내성 증가뿐만 아니라 건조나 저온 스트레스 등 복합스트레스에 대한 내성을 조사할 예정이다. 최근 들어 심각하게 나빠지고 있는 지구환경에 대비하여 건조, 저온, 고염 스트레스 등의 복합스트레스에 저항성을 가지며, 높은 수량을 가지는 고구마 품종이 개발될 수 있을 것이다.

## 적 요

식물이 환경스트레스에 노출되게 되면 과다한 활성산소의 축적으로 인한 산화스트레스가 발생한다. 그러므로 재해내성 작물개발을 위한 분자유종의 재료로써 스트레스 내성 고구마 품종을 선발하기 위해, 본 연구에서는 10종의 고구마의 잎 disc에 산화스트레스 유도원인 methyl viologen (MV)을 처리하였다.

MV 처리 후 각 고구마 품종의 이온전도도는 DPPH radical 소거활성과 높은 상관관계를 나타내었다. 본 연구에서 낮은 이온전도도 값과 높은 DPPH radical 소거활성 및 전체 페놀함량을 나타낸 Yanshu 8, 신허미, 신자미 세 품종을 산화스트레스 내성 품종으로 선발할 수 있었다. 본 연구의 결과를 통해 DPPH radical 소거활성이 복합재해내성 작물선발을 위한 좋은 실험방법임을 알 수 있었으며, 산화스트레스 내성 고구마 품종들이 보인 MV에 대한 내성은 증가된 항산화 활성과 연관된 것임을 알 수 있었다.

## 사 사

본 연구는 2009년도 한국생명공학연구원 주요사업, 한중공동연구프로그램의 지원으로 수행되었다.

## 인용문헌

- Asada K (1999) The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens oxydissipation of excess photons. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 50:601-639
- Emdadul Haque Md, Yoshida Y, Hasunuma K (2009) Paraquat-resistant lines in *Pisum sativum* cv. Alaska: biochemical and phenotypic characterization. *Plant Biotechnol Rep* 2:21-31
- Huh GH, Lee SJ, Bae YS, Liu JR, Kwak SS (1997) Molecular cloning and characterization of cDNAs for anionic and neutral peroxidases from suspension cultured cells of sweetpotato and their differential expression in response to stress. *Mol Gen Genet* 255: 382-391
- Jang, IC, Park SY, Kim KY, Kwon SY, Kim GK, Kwak SS (2004) Differential expression of 10 sweetpotato peroxidase genes in response to bacterial pathogen, *Pectobacterium chrysanthem*. *Plant Physiol Biochem* 42:451-455
- Kim KY, Huh GH, Kwon SY, Lee HS, Hur Y, Bang JW, Choi KS, Kwak SS (2000) Differential expression of four sweetpotato peroxidase genes in response to abscisic acid and ethephon. *Phytochemistry* 54:19-22
- Kim KY, Huh GH, Lee HS, Kwon SY, Hur Y, Kwak SS (1999) Molecular characterization of two anionic peroxidase cDNAs isolated from suspension cultures of sweetpotato. *Mol Gen Genet* 261:941-947
- Kim YH, Kim CY, Song WK, Park DS, Kwon SY, Lee HS, Bang JW, Kwak SS (2008a). Overexpression of sweetpotato *swpa4* peroxidase results in increased hydrogen peroxide production and enhances stress tolerance in tobacco. *Planta* 227:867-881.
- Kim YH, Lim S, Han SH, Lee JC, Song WK, Bang JW, Kwon SY, Lee HS, Kwak SS (2007) Differential expression of ten sweetpotato peroxidases in response to sulfur dioxide, ozone, and ultraviolet radiation. *Plant Physiol Biochem* 45:908-914
- Kim YH, Lim S, Yang KS, Kim CY, Kwon SY, Lee HS, Wang X, Zhou Z, Ma D, Yun DJ, Kwak SS (2009) Expression of *Arabidopsis NDPK2* increases antioxidant enzyme activities and enhances tolerance to multiple environmental stresses in transgenic sweetpotato plants. *Mol Breeding* 24:233-244
- Kim YH, Yang KS, Kim CY, Ryu SH, Song WK, Kwon SY, Lee HS, Bang JW, Kwak SS (2008b) Molecular cloning of peroxidase cDNAs from dehydration-treated fibrous roots of sweetpotato and their differential expression in response to stress. *BMB Rep.* 41: 259-265.
- Lim S, Kim YH, Kim SH, Kwon SY, Lee HS, Kim JG, Cho CY, Paek KY, Kwak SS (2007) Enhanced tolerance of transgenic sweetpotato plants expressing both superoxide dismutase and ascorbate peroxidase in chloroplasts against methyl viologen-mediated oxidative stress. *Mol Breeding* 19:227-239
- Noctor G, Foyer CH (1998) Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 49: 249-279
- Padda MS, Picha DH (2008) Effect of low temperature storage on phenolic composition and antioxidant activity of sweetpotatoes. *Postharvest Biol Tech* 47:176-180
- Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G (1997) Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trend Plant Sci* 2:152-159
- Sgherri C, Stevanovic B, Navari-Izzo F (2004) Role of phenolics in the antioxidative status of the resurrection plant *Ramonda serbica* during dehydration and rehydration. *Physiol Plant* 122:478-485
- Stadnik MJ, Buchenauer H (2000) Inhibition of phenylalanine ammonia-lyase suppresses the resistance induced by benzothiadiazole in wheat to *Blumeria graminis* f. sp. *tritici*. *Physiol Mol Plant Pathol* 57:25-34
- Wang WB, Kim YH, Lee HS, Kim KY, Deng XP, Kwak SS (2009) Analysis of antioxidant enzyme activity during germination of alfalfa under salt and drought stresses. *Plant Physiol Biochem* 47: 570-577
- Yun BW, Huh GH, Lee HS, Kwon SY, Jo JK, Kim JS, Cho KY, Kwak SS (2000) Differential resistance to methyl viologen in transgenic tobacco plants that express sweetpotato peroxidases. *J Plant Physiol* 156:504-509